

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
12. Jg. 1974, S. 73–80

## Neue Mikroelektrophorese für nativen Lumballiquor. Unterschiede im Pherogramm von nativen und konzentrierten Proteinen

### *Zur Methodik der Proteinelektrophorese auf Celluloseacetatfolie im Liquor cerebrospinalis, II. Mitteilung*

Von T. O. Kleine und J. Stroh

*Aus dem klinisch-chemischen Laboratorium (Leiter: Prof. Dr. T. O. Kleine) der Universitäts-Nervenklinik  
(Direktor: Prof. Dr. H. Jacob) Marburg/Lahn*

(Eingegangen am 30. August/30. November 1973)

Es wird eine empfindliche Mikroproteinelektrophorese für nativen Liquor cerebrospinalis präsentiert, die gegenüber bekannten Methoden mit angereicherten Liquorproteinen folgende Vorteile aufweist:

1. Zeitersparnis, da keine Liquorkonzentrierung erforderlich;
2. Volumensparnis, da 1 bis 2  $\mu$ l nativer Liquor von maximal 0,8  $\mu$ g Gesamtprotein benötigt werden;
3. Keine Denaturierung und Verlust von Liquorproteinen, wie sie z. B. bei Vakuumfiltration mittels Kollodiumhülsen beobachtet werden: Präalbuminverminderung und Abwandern von Material der  $\gamma$ - und  $\beta$ -Globulinbande in die  $\alpha$ -Globulinbanden.
4. Keine Verzerrung des Liquorpherogrammes durch unkontrollierbare Farbauswaschung einzelner Proteinbanden, da die Celluloseacetatfolie nicht transparent gemacht wird.

Mittels Trennkammer und Mikrozonens-Densitometer mit Digital-Integrator der Fa. Beckman werden 6 Fraktionen (Präalbumin, Albumin,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Globulin) erhalten unter folgenden Bedingungen: 30 min Trennzeit bei 250 Volt im 0.135 mol/l Veronal-Veronal-Na-Puffer, Auftragsmenge maximal 0,8  $\mu$ g Gesamtprotein, da Farbstoffsättigung für das im Liquor am höchsten konzentrierte Protein Albumin ab 0,5  $\mu$ g eintritt. Unter diesen Bedingungen färben sich Albumin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin im linear-proportionalen Bereich in einem Verhältnis von 1:0,59:0,38:0,55 an. Die Reproduzierbarkeit der Methode wird mittels Fehlerermittlungen demonstriert.

### *A new micro-electrophoretic procedure for untreated liquor cerebrospinalis. Differences in the pherogram of native and concentrated proteins. Studies on the protein electrophoresis of liquor cerebrospinalis with cellulose acetate membranes, II.*

A new sensitive micro-electrophoretic procedure for untreated liquor cerebrospinalis is described which has the following advantages over the known procedures using concentrated liquor:

1. time saving since no concentration step is needed,
2. volume saving because only 1 to 2  $\mu$ l of untreated liquor cerebrospinalis is used containing not more than 0.8  $\mu$ g of the total proteins,
3. there is no denaturation and no loss of proteins. This is in contrast to vacuum ultrafiltration in collodion bags, where a loss of praealbumin and migration of the proteins from the  $\gamma$ - and  $\beta$ -globulin bands to  $\alpha$ -globulin bands are observed.
4. there is no distortion of the pattern of protein bands caused by a washing-out-effect of the protein bound dye because the cellulose acetate strip is not made transparent.

Using Beckman's separating chamber and Microzone-Densitometer with the digital integrator system 6 fractions (praealbumin, albumin,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -globulin) are obtained under the following conditions: 250 volts for 30 min in a 0.135 mol/l veronal-veronal-Na-buffer; 0.8  $\mu$ g of total protein is the maximum because the saturation limit for staining with Ponceau S occurs for albumin at the 0.5  $\mu$ g level. Using these conditions albumin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -globulins are stained with relative intensities of 1:0.59:0.38:0.55. The reproducibility of this procedure is established by error calculations.

Die elektrophoretische Auftrennung von Liquorproteinen wird routinemäßig nur nach Anreicherung derselben auf Papier (1–14) oder Celluloseacetat (15–23) durchgeführt. Versuche, Liquorproteine im nativen, unkonzentrierten Liquor cerebrospinalis auf Papier (10, 24) oder Celluloseacetat (18) elektrophoretisch aufzutrennen, konnten sich in der Routine infolge methodischer Mängel und unbefriedigender Ergebnisse nicht durchsetzen. Vorversuche (s. voranstehende Arbeit) haben jedoch gezeigt, daß bei zwei verschiedenen Einengungs-

verfahren z. T. starke Verluste an nieder- und hochmolekularen Proteinen auftreten, die zu Fehlern bei der Beurteilung des Liquorpherogramms führen müssen. Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit versucht, eine empfindliche Mikro-Methode zur elektrophoretischen Trennung der Proteine des nativen Liquor cerebrospinalis im  $\mu$ g-Bereich auszuarbeiten. Die damit erhaltenen Ergebnisse werden mit solchen aus eingengtem Liquor verglichen.

## Methodik

### Entfernung der Zellen des Liquor cerebrospinalis und Proteinbestimmung

Steriler, frisch erhaltener Lumballiquor wird in einer Filtrationsapparatur (SM 16315) der Sartorius-Werke, Göttingen, serienmäßig durch ein Membranfilter (SM 11605) der Porengröße 0,6  $\mu\text{m}$  bei 25° C filtriert. Im zellfreien Liquor wird die Proteinkonzentration mittels einer modifizierten Biuret-Methode (s. voranstehende Arbeit) gemessen.

### Konzentrierung von Liquor cerebrospinalis mittels Vakuum-Ultrafiltration

Je 10 ml Lumballiquor von 12 Patienten mit unterschiedlichen Krankheiten bzw. 100 ml Sammelliquor werden nach Entfernung der Zellen (s. o.) in einer Apparatur (SM 16314) der Sartorius-Werke, Göttingen, in vorher gewässerten Kollodium-Hülsen (SM 13200) mittels Unterdruck einer Wasserstrahlpumpe bei 4° C auf etwa 0,1 ml bzw. 3 ml eingengt. Zur Einengung werden 2 bzw. 16 h benötigt.

### Elektrophorese

#### Reagenzien und Zubehör

1. Celluloseacetatfolien (SM 11200) 5,7 x 14,5 cm der Sartorius-Werke, Göttingen,
2. Puffer-, Färb-, Entfärb- und Transparenzlösungen werden teilweise von der Fa. Beckman, München, bezogen.  
Pufferzusammensetzung:  
a) 2,76 g Diäthylbarbitursäure + 15,4 g Na-Diäthylbarbiturat (0,090 mol/l Veronal-Puffer pH 8,6)  
b) 4,14 g Diäthylbarbitursäure + 23,1 g Na-Diäthylbarbiturat (0,135 mol/l Veronal-Puffer)  
c) 5,52 g Diäthylbarbitursäure + 30,8 g Na-Diäthylbarbiturat (0,179 mol/l Veronal-Puffer)  
Färbelösung:  
2 g Ponceau S, 30 g Trichloressigsäure, 30 g Sulfosalicylsäure in 1000 ml Wasser gelöst.  
Entfärbelösung:  
0,833 mol/l wäßr. Essigsäure (E. Merck, Darmstadt).  
Transparenzlösung:  
700 ml Dioxan + 300 ml Isobutylalkohol (E. Merck, Darmstadt).
3. Herstellung von Eichlösungen  
Humanalbumin (98%, reinst), Human- $\alpha$ -Globulin (> 95%), Human- $\beta$ -Globulin (> 95%) und Human- $\gamma$ -Globulin (> 98%) der Fa. Serva, Heidelberg, werden in 0,15 mol/l NaCl-Lösung gelöst und entsprechend verdünnt. Human- $\beta$ -Globulin wird im alkalischen Milieu gelöst. Als Eichserum wird Monitrol, in 0,15 mol/l NaCl-Lösung 1:10 verdünnt, verwendet.

#### Geräte

Auftragsstempel für 0,25  $\mu\text{l}$  und 1  $\mu\text{l}$  von Fa. Boskamp, Gerätebau KG, Hersel-Bonn.  
Beckman-Trennkammer-Modell R-200 mit Netzgerät Modell 4264, Mikrozonendensitometer plus Digital-Integrator Modell R-110 + 111 der Fa. Beckman, München.  
Mit entsprechenden Geräten anderer Firmen wurden nur unbefriedigende Ergebnisse bei der Auswertung von Mikropherogrammen von Liquorproteinen auf nicht-transparenten Folien erzielt.

#### Arbeitsweise

1. Anfertigung von Liquorpherogrammen:  
Nach 2 min Vorpuffern der Folie in Kammer-Puffer kurzes Abtupfen zwischen Filterpapier und Spannen derselben im Trennrahmen. Nach 2 min Vorlauf bei 250 V Auftragen der jeweiligen Proteinlösung mit 0,25  $\mu\text{l}$ -Auftragsstempel bei konzentrierten Likoques oder 1  $\mu\text{l}$ -Stempel bei nativen Likoques, 10 s Einziehzeit. Bei Lumballikoques mit einem Gesamtproteingehalt von weniger als 0,400 g/l werden zweimal 1  $\mu\text{l}$  der gleichen Lösung aufgetragen, bei Likoques bis 0,800 g/l 1  $\mu\text{l}$ , bei Likoques mit höherem Gesamtproteingehalt als

0,800 g/l muß entsprechend mit 0,15 mol/l NaCl-Lösung verdünnt werden (s. Ergebnisse). 20 min bzw. 30 min Trennzeit bei 250  $\pm$  2,5 V. Nach Beendigung der Elektrophorese Folie sofort 5 min in Färbelösung bringen, dann 5 min in Entfärbelösung (3maliger Wechsel der Kammer). Gründliches Trocknen der Folie für einige Stunden an der Luft und Einlegen derselben in eine Klarsichthülle (Beckman Nr. 326189). Längeres Färben (20 min) brachte keine Unterschiede.

Zum Transparentmachen der Folie nach Entfärbelösung luftblasenfrei und naß auf Glasplatte aufziehen, 5 min Transparenzbad, 15 min bei 90–100° C trocknen, in bidest. Wasser legen und abziehen, zwischen Filterpapier trocknen, dann in Klarsichthülle im Dunkeln aufbewahren. Nicht-transparente Folien werden bei 520 nm, Spalt 0,2/2,5 MM, gescannt; transparente bei 0,2/1,4 CAL. Eichung der Flächenintegrale erfolgt monatlich.

#### 2. Anfertigung von Eich-Elektropherogrammen

Nach Vorpuffern in 0,135 mol/l-Veronal-Puffer (vgl. oben) und einmaligem Auftragen von 1  $\mu\text{l}$  verdünnter Eichlösung wird für Humanalbumin 10 min, für Human- $\alpha$ -Globulin 2 min 250 V angelegt werden, wie oben angefärbt und auf der nicht-transparenten Folie die Farbintensität des angefärbten Proteinflecks von etwa 0,1  $\text{cm}^2$  Größe unter gleichbleibenden Bedingungen integriert.

#### Statistische Berechnung und Fehlerermittlungen

Mittelwert mit Standardabweichung und Unterschied zweier Mittelwerte nach dem t-Test von *Student* für nicht-gepaarte Daten werden nach einem Programm (Archiv-Nr. 10371) der Fa. Diehl im Tischrechner Combitron S errechnet, der Variationskoeffizient VK% nach *Büttner* et al (25).

Außerdem werden ermittelt (vgl. 26):

Der *absolute Gerätefehler* wird durch die 10malige Auswertung des gleichen Pherogramms, ohne Veränderung an Folien- und Geräteeinstellung vorzunehmen, gemessen.

Der *individuelle Fehler* wird durch das 10malige Auswerten des gleichen Pherogramms nach 10maligem Neueinlegen der Folie ermittelt.

Der *Bandenfehler* wird durch 8maliges Auftragen des gleichen Likoques bestimmt.

Der *Zeitfehler* wird auf einer Folie mit 4 Pherogrammen am ersten, 40sten, 52sten und 240sten Tag nach Anfertigung derselben ermittelt. Die Folie wird in der Zwischenzeit unter Lichtverschluß aufbewahrt.

Die zu diesen Fragen vorgenommenen Untersuchungen besitzen nur Stichproben-Charakter.

## Ergebnisse

### Untersuchungen zur Wahl der Pufferkonzentration bei der Proteinelektrophorese von nativem Lumballiquor auf nicht-transparenter Celluloseacetatfolie

In Vorversuchen konnte mittels Gefriertrocknung konzentriertes Liquorprotein in 0,090 mol/l, 0,135 mol/l und 0,179 mol/l Veronal-Puffer nach einer Laufzeit von 20 oder 30 min auf *nicht*-transparenter Celluloseacetatfolie nicht befriedigend aufgetrennt werden (vgl. 27, 28). Dagegen ließen sich 1,8  $\mu\text{g}$  mittels Vakuum-Ultrafiltration konzentriertes Liquorprotein auf der gleichen Folie in 0,090 mol/l Veronal-Puffer nach 30 min Laufzeit in 7 gut profilierte Banden fraktionieren: Präalbumin, Albumin,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\gamma$ -Globulinfraktion. In 0,179 mol/l Veronal-Puffer erfolgte dagegen keine befriedigende Auftrennung.

Werden kleinere Proteinmengen eines *nativen* Lumballikoques (ca. 0,6  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein) 30 min in 0,090 mol/l Veronal-Puffer auf *nicht*-transparenter

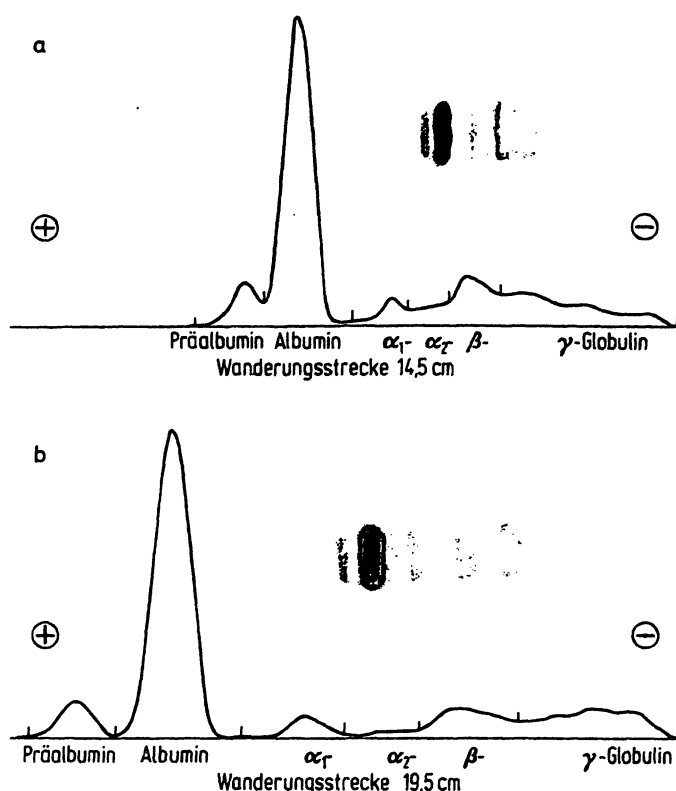


Abb. 1. Der Einfluß der Pufferkonzentration auf die elektrophoretische Trennung von nativem Lumballiquor auf nichttransparenter Celluloseacetatfolie. Etwa 0,6 µg Gesamtprotein werden 30 min bei 250 V bei a) in 0,135 mol/l bei b) in 0,090 mol/l Veronal-Puffer pH 8,6 auf Celluloseacetatfolie aufgetrennt, fixiert und mit Ponceau S angefärbt, getrocknet und nach Scannen im Traut Simplex (J. Cress & Sohn, Gartenberg/Obb.) im Durchlicht photographiert (Lichtquelle: ca. 1 kW, Filter: 520 nm, Blende 11, Belichtung 5 s, Agepe-FF-Film; 2,4fach vergrößert auf BH 1 (Agfa-Gevaert, Leverkusen), 4 min Entwicklung mit Enkobrom (Fa. Tetenal, Hamburg)). Weitere Einzelheiten s. Methodik.

Celluloseacetatfolie aufgetrennt, so werden nur 5 Banden erhalten (Abb. 1): Präalbumin, Albumin,  $\alpha_1$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin. Letzteres ist stark überlagert von an der Auftragsstelle lieengebliebenem angefärbtem Protein. Eine klare Auftrennung der  $\alpha$ -Globulinbande in eine  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Bande läßt sich nicht feststellen infolge schlechter Auftrennung (Untergrundschmierungen von Proteinen) der lang auseinandergezogenen und etwas verwaschenen Banden (Pherogrammmlänge 19,5 cm, s. Abb. 1). Auch trennt sich die  $\beta$ -Globulinbande nicht klar in eine  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Bande auf.

Die gleiche Menge an Gesamtprotein (etwa 0,6 µg) wird in 0,135 mol/l Veronal-Puffer auf *nicht*-transparenter Celluloseacetatfolie in die gleichen 5 Fraktionen separiert, jedoch sind die Banden im kürzeren Pherogramm (14,5 cm) jetzt schmaler und schärfer abgegrenzt (Abb. 1). Bei diesem Puffer bleiben deutlich weniger Proteine an der Auftragsstelle liegen und interferieren mit der  $\gamma$ -Globulinbande. Außerdem ist die Abgrenzung einer  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Globulinbande möglich, nicht dagegen eine Auftrennung der  $\beta$ -Globulinbande in  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Banden (Abb. 1).

Diese Unterschiede in den Pherogrammen zeigen sich auch in der statistischen Auswertung von jeweils 4 Pherogrammen, die in 0,090 mol/l bzw. 0,135 mol/l Veronal-Puffer aufgetrennt worden sind: Bei 2 von 3 Liquores werden im Pherogramm in 0,090 mol/l Puffer deutlich niedrigere  $\alpha_2$ - und  $\beta$ -Globulinbanden bei relativ höheren Albuminbanden gemessen im Vergleich zum Pherogramm in 0,135 mol/l Puffer (Tab. 1).

Damit eignet sich für die Elektrophorese von nativen Liquorproteinen ein 0,135 mol/l Veronal-Veronal-Na-Puffer bei 30 min Trennzeit unter den angegebenen Bedingungen.

Tab. 1. Der Einfluß der Pufferkonzentration auf die elektrophoretische Trennung von nativen Liquorproteinen. Mittelwert von jeweils vier Läufen mit Standardabweichung auf *nicht*-transparenter Celluloseacetatfolie. Veronalpuffer, 30 min Laufzeit bei 250 V. Da sich eine deutliche Abgrenzung einer  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Globulinbande nicht erzielen läßt, wird nur eine  $\beta$ -Globulinfraktion angegeben. Weitere Einzelheiten s. Methodik.

Trennbedingungen:			Elektrophoresebanden (rel. %)					
Veronal-Pufferkonzentration [mol/l]	Liquor-protein-gehalt [g/l]	Auftrags-menge an Protein [µg]	Präalbumin	Albumin	$\alpha_1$ -Globulin	$\alpha_2$ -Globulin	$\beta$ -Globulin ( $\beta_{1+2}$ )	$\gamma$ -Globulin
0,090	0,210	0,4	8,8 ± 0,3	58,6 ± 1,8	5,6 ± 0,5	4,2 ± 0,5	12,7 ± 0,9	10,3 ± 0,8
Unterschied im t-Test 0,135	0,210	0,4	9,5 ± 0,8	56,8 ± 1,7	5,6 ± 0,8	4,1 ± 0,5	13,3 ± 1,2	10,7 ± 1,1
0,090	0,326	0,6	7,1 ± 0,7	62,7 ± 2,4	4,2 ± 0,6	1,7 ± 0,4	10,7 ± 0,5	13,6 ± 1,2
Unterschied im t-Test 0,135	0,326	0,6	p < 0,05 8,3 ± 0,5	p < 0,01 57,3 ± 0,3	4,8 ± 0,3	p < 0,005 3,5 ± 0,5	p < 0,05 12,3 ± 0,9	13,9 ± 0,4
0,090	0,460	0,4	4,0 ± 0,5	74,2 ± 0,9	3,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	8,0 ± 0,4	9,0 ± 0,3
Unterschied im t-Test 0,135	0,460	0,4	4,3 ± 0,2	p < 0,01 67,9 ± 3,0	3,6 ± 0,4	p < 0,001 3,1 ± 0,4	p < 0,01 11,1 ± 1,5	10,1 ± 1,1

### Untersuchung zur Farbstoff-Proteinbindung einzelner Humanproteine auf der nicht-transparenten Celluloseacetatfolie

Wird jeweils 1  $\mu$ l einer Proteinlösung steigender Konzentration auf einer Celluloseacetatfolie aufgetragen, mit Ponceau S angefärbt und der proteingebundene Farbstoff des angefärbten Proteinfleckes als Flächenintegral gemessen, so ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der Farbstoff-Proteinbindung nur bei Auftragsmengen von 0,1 bis 0,5  $\mu$ g Humanalbumin und von 0,1–0,6  $\mu$ g Human- $\alpha$ -Globulin (Abb. 2). Hingegen wird für 0,1 bis 1,0  $\mu$ g denaturierten Human- $\beta$ -Globulins bzw.  $\gamma$ -Globulin eine linear zunehmende Anfärbbarkeit erhalten. Allerdings ist die Farbstoff-Proteinbindung bei den drei Globulinfraktionen im Vergleich zu Albumin deutlich geringer: Es läßt sich folgende Farbstoffbindungsrelation aufstellen: Albumin:  $\alpha$ -:  $\beta$ -:  $\gamma$ -Globulin wie 1: 0,59: 0,38: 0,55.

Werden daraufhin die Pherogramme desselben Sammelliquors in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe untersucht (Tab. 2), so fällt auf, daß ab einer Auftragsmenge von größer als 0,5  $\mu$ g Humanalbumin eine signifikante Abnahme seiner Relativ-Prozente auftritt bei einer gleichzeitigen signifikanten Zunahme der  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$  und  $\gamma$ -Globulinfraktionen. Dabei sind in den  $\beta_2$ - und  $\gamma$ -Globulinbanden Proteinmengen enthalten, die noch im Linear-Bereich ihrer Anfärbbarkeit liegen (s. Abb. 2). Auffallend ist, daß bei sich vermindernden Albuminmengen zuerst eine signifikante Zunahme der Relativ-Prozente im  $\beta$ -Globulin-Bereich des Pherogramms festzustellen ist.

Daraus ergibt sich, daß nur Liquores mit einem Gesamtproteingehalt von kleiner als 0,800 g/l adäquat untersucht werden können. Höher konzentrierte Liquores müssen entsprechend verdünnt werden.

### Vergleich der Elektropherogramme von nativem Lumballiquor auf nicht-transparenter Celluloseacetatfolie mit solchen von mittels Vakuum-Ultrafiltration konzentrierten Lumballiquores auf transparenter Celluloseacetatfolie

Um Ergebnisse einer bereits gebräuchlichen Methodik der Elektrophorese von eingegengtem Liquor auf transparenter Celluloseacetatfolie mit Pherogrammen von nativem Lumballiquor auf nicht-transparenter Celluloseacetatfolie vergleichen zu können, werden beide Methoden gleichzeitig an demselben Lumballiquor durchgeführt.

Sowohl beim Vergleich des Pherograms mit 0,090 mol/l Puffer als auch des Pherogramms mit 0,135 mol/l Puffer zweier nativer Liquores auf nicht-transparenter Celluloseacetatfolie mit entsprechenden Pherogrammen des mittels Vakuum-Ultrafiltration eingegengten Liquors auf transparenter Celluloseacetatfolie läßt sich ein Abwandern von Proteinen der  $\gamma$ -Globulinbande in die  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - oder  $\beta$ -Globulinbände feststellen (Tab. 3). Außerdem wird beim Vergleich von zehn 0,135 mol/l

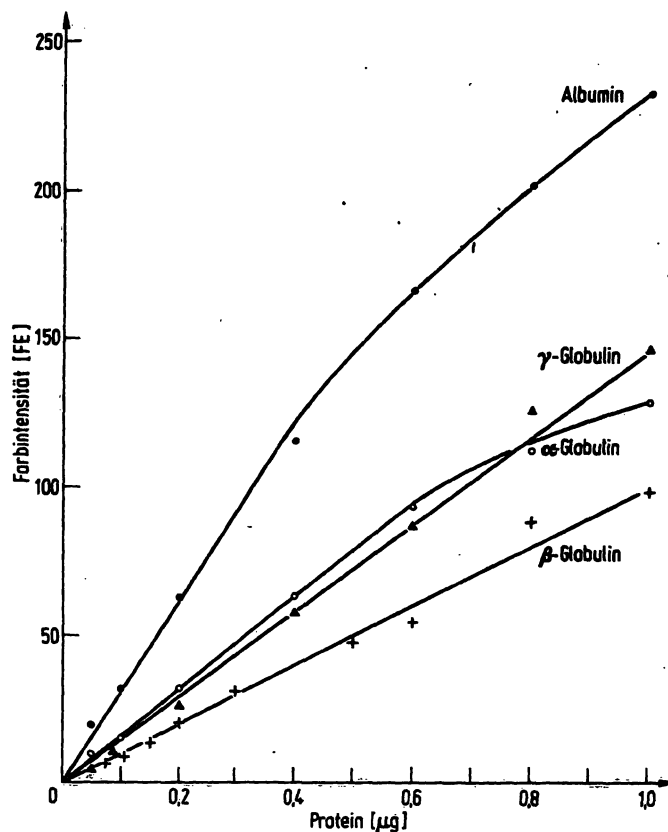


Abb. 2. Ponceau-S-Anfärbung von Human-Albumin, Human- $\alpha$ -Globulin, Human- $\beta$ -Globulin und Human- $\gamma$ -Globulin in Abhängigkeit seiner Konzentration. 1  $\mu$ l der jeweiligen Proteineichlösung wird auf mit 0,135 mol/l Veronal-Puffer getränkte Celluloseacetatfolien aufgetragen, mit Ponceau S angefärbt und die Farbintensität des angefärbten Proteinfleckes von ca. 0,1 cm<sup>2</sup> Größe unter gleichbleibenden Bedingungen integriert: FE = beliebige Flächeneinheiten. Weitere Einzelheiten s. Methodik.

Pherogrammen nativer Liquorproteine (Konzentrationsbereich 0,173–0,432 g/l) auf nicht-transparenter Celluloseacetatfolie mit entsprechenden Pherogrammen mit 0,090 mol/l Puffer der konzentrierten Proteine auf transparenter Celluloseacetatfolie eine signifikante Verminderung der Präalbuminfraktion (7mal) neben verminderten  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulinfraktionen (8 bzw. 9mal) beobachtet bei gleichzeitig relativ erhöhter Albumin- (4mal),  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Globulinfraktion (je 7mal) (Tab. 4). Diese Befunde weisen nach Vakuum-Ultrafiltration-Behandlung auf ein Abwandern von Proteinen aus der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulinfraktion in Richtung der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Globulinfraktion hin. Eine relative Zunahme der Albuminbande läßt sich nicht immer auf Kosten einer Verminderung der Präalbuminbande erklären.

### Fehlerermittlung bei der Liquorelektrophorese auf nicht-transparenter Celluloseacetatfolie

Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, ist der individuelle Fehler meistens größer ausgefallen als der absolute Gerätefehler. Jedoch ist in beiden Fällen der Variationskoeffizient für die  $\gamma$ -Globulinfraktion am größten von allen Fraktionen, dann folgen  $\alpha_2$ -,  $\alpha_1$ -Globuline, Prä-

Tab. 2. Ponceau S-Anfärbung der elektrophoretisch getrennten Liquorproteine in Abhängigkeit ihrer Konzentration.

Mittelwert von jeweils vier Elektropherogrammen mit Standardabweichung auf *nicht*-transparenter Celluloseacetatfolie eines mittels Vakuum-Ultrafiltration eingeeengten Sammelliquors bzw. dessen Verdünnungen. Auftragsmenge 1 µl. Trennbedingungen: 30 min bei 250 V in 0,090 mol/l Veronalpuffer pH 8,6. Weitere Einzelheiten s. Methodik. Der Anteil an Albumin, IgG, IgA und IgM wurde mittels einfacher radialer Immundiffusion bzw. mittels nephelometrischer Antigen-Antikörpermessungen ermittelt (s. vorige Arbeit).

Fraktion		Liquor cerebrospinalis				
		Gesamtprotein-Gehalt				
		0,230 g/l	0,460 g/l	0,920 g/l	1,310 g/l	1,840 g/l
Präalbumin	rel. %	7,7 ± 1,0	6,7 ± 0,6	6,5 ± 0,7	6,6 ± 0,9	7,8 ± 0,7
Albumin	rel. %	61,2 ± 2,5	60,7 ± 1,4	58,2 ± 2,3	56,9 ± 2,3	51,1 ± 1,8
Unterschied im t-Test	µg	0,12	0,25	0,50	p < 0,05 0,71	p < 0,001 1,00
α <sub>1</sub> -Globulin	rel. %	5,4 ± 1,2	5,9 ± 0,3	6,1 ± 0,6	5,8 ± 1,1	6,1 ± 0,3
α <sub>2</sub> -Globulin	rel. %	4,4 ± 0,9	3,9 ± 0,9	4,8 ± 0,2	5,1 ± 0,4	6,7 ± 0,5
Unterschied im t-Test					p < 0,05	p < 0,005
β <sub>1</sub> -Globulin	rel. %		9,3 ± 0,6	9,3 ± 0,4	10,3 ± 1,5	10,8 ± 1,1
Unterschied im t-Test		(11,3 ± 0,7 für β <sub>1+2</sub> )				p < 0,05
β <sub>2</sub> -Globulin	rel. %		3,5 ± 0,3	4,4 ± 0,4	4,7 ± 0,4	5,2 ± 0,4
Unterschied im t-Test				p < 0,005	p < 0,005	p < 0,001
IgMA	µg	0,02	0,04	0,08	0,11	0,16
γ-Globulin	rel. %	10,1 ± 0,5	10,2 ± 1,3	10,7 ± 0,5	10,8 ± 0,3	12,4 ± 0,5
Unterschied im t-Test	µg	0,02	0,04	0,08	0,11	p < 0,02 0,16

Tab. 3. Der Einfluß von Vakuum-Ultrafiltration und Elektrophoresepufferkonzentration auf die Zusammensetzung des Pherogramms von Liquorproteinen.

Mittelwert von jeweils vier Läufen mit Standardabweichung vor und nach Konzentrierung zweier Likoeres auf *nicht*-transparenter bzw. transparenter Celluloseacetatfolie unter zwei verschiedenen Pufferkonzentrationen für 30 min Laufzeit und 250 V. Da sich im *nicht*-transparenten Pherogramm eine β<sub>1</sub>- und β<sub>2</sub>-Globulinbande nicht immer abgrenzen läßt, wird nur eine β-Globulinbande angegeben. Weitere Einzelheiten s. Methodik.

Trennbedingungen		Liquor-protein-gehalt [g/l]	Auftrags-menge an Protein [µg]	Elektrophoresebanden (rel. %)					
Veronal-Puffer-konzentration [mol/l]	Cellulose-Acetatfolie			Präalbumin	Albumin	α <sub>1</sub> -Globulin	α <sub>2</sub> -Globulin	β-Globulin (β <sub>1+2</sub> )	γ-Globulin
0,090	nicht-transparent	0,326	0,6	7,1 ± 0,7	62,7 ± 2,4	4,2 ± 0,6	1,7 ± 0,4	10,7 ± 0,5	13,6 ± 1,2
Unterschied im t-Test							p < 0,01		p < 0,01
0,090	transparent	12,800	6	7,1 ± 1,2	63,5 ± 3,6	4,4 ± 0,4	4,3 ± 0,9	11,3 ± 0,5	9,6 ± 1,4
0,090	nicht-transparent	0,460	0,4	4,0 ± 0,5	74,2 ± 0,9	3,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	8,0 ± 0,4	9,0 ± 0,3
Unterschied im t-Test							p < 0,001	p < 0,001	p < 0,005
0,090	transparent	36,500	9	3,1 ± 0,7	72,9 ± 2,2	3,4 ± 0,5	4,5 ± 0,7	9,8 ± 0,3	6,4 ± 1,0
0,135	nicht-transparent	0,326	0,6	8,2 ± 0,7	58,7 ± 0,4	4,5 ± 0,4	2,9 ± 0,3	12,5 ± 0,9	13,1 ± 0,6
Unterschied im t-Test							p < 0,005		p < 0,01
0,135	transparent	12,800	6	7,3 ± 0,8	61,5 ± 2,5	5,1 ± 0,9	4,1 ± 0,4	12,3 ± 1,0	9,9 ± 1,5
0,135	nicht-transparent	0,460	0,4	4,3 ± 0,2	67,9 ± 3,0	3,6 ± 0,4	3,1 ± 0,4	11,1 ± 1,5	10,1 ± 1,1
Unterschied im t-Test						p < 0,02	p < 0,02		p < 0,01
0,135	transparent	36,500	9	4,1 ± 0,2	69,6 ± 1,3	5,1 ± 0,7	3,9 ± 0,3	9,9 ± 0,1	7,4 ± 0,7

Tab. 4. Elektropherogramme von nativen und mittels Vakuum-Ultrafiltration konzentrierten Liquorproteinen.

Mittelwert von jeweils vier Läufen mit Standardabweichung eines nativen Liquors auf *nicht*-transparenter Celluloseacetatfolie (0,135 mol/l Veronal-Puffer) im Vergleich zu dessen mittels Vakuum-Ultrafiltration gewonnenen Konzentrates auf transparenter Folie (0,090 mol/l Veronal-Puffer) bei gleicher Laufzeit von 30 min bei 250 V. Wegen Nichtauftrennung der  $\beta$ -Globulinfraktion in  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Banden im 0,135 mol/l-Pherogramm wird nur eine  $\beta$ -Globulinbande angegeben. Weitere Einzelheiten s. Methodik.

Gesamtprotein [g/l]	Konzentrierung	Elektrophoresebanden (rel. %)					
		Präalbumin	Albumin	$\alpha_1$ -Globulin	$\alpha_2$ -Globulin	$\beta$ -Globulin ( $\beta_{1+2}$ )	$\gamma$ -Globulin
0,173	—	11,1 $\pm$ 0,9	49,9 $\pm$ 1,1	5,2 $\pm$ 0,9	3,2 $\pm$ 0,3	14,2 $\pm$ 1,1	16,4 $\pm$ 0,9
19,819	115fach	10,1 $\pm$ 0,4	54,2 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 0,5	12,6 $\pm$ 0,5	10,1 $\pm$ 0,3
Unterschied im t-Test		p < 0,2	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,001
0,185	—	7,2 $\pm$ 0,2	55,5 $\pm$ 0,3	3,9 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,3	15,3 $\pm$ 0,7	14,6 $\pm$ 1,3
20,721	112fach	7,6 $\pm$ 0,6	57,5 $\pm$ 1,6	6,7 $\pm$ 0,7	5,6 $\pm$ 0,3	12,8 $\pm$ 0,4	9,8 $\pm$ 0,9
Unterschied im t-Test		p < 0,3	p < 0,1	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,005	p < 0,001
0,187	—	10,7 $\pm$ 0,5	52,6 $\pm$ 2,1	4,8 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,6	14,1 $\pm$ 1,2	14,6 $\pm$ 1,4
14,775	79fach	9,6 $\pm$ 0,7	54,2 $\pm$ 0,9	7,1 $\pm$ 0,8	5,1 $\pm$ 0,5	14,4 $\pm$ 0,6	9,7 $\pm$ 1,8
Unterschied im t-Test		p < 0,05	p < 0,2	p < 0,005	p < 0,01	p < 0,7	p < 0,005
0,198	—	11,2 $\pm$ 0,3	54,5 $\pm$ 1,1	4,7 $\pm$ 0,5	2,6 $\pm$ 0,3	12,9 $\pm$ 0,6	14,2 $\pm$ 0,9
10,631	54fach	9,0 $\pm$ 0,4	55,9 $\pm$ 0,9	6,3 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,7	13,5 $\pm$ 0,8	10,0 $\pm$ 1,3
Unterschied im t-Test		p < 0,001	p < 0,1	p < 0,005	p < 0,001	p < 0,3	p < 0,005
0,216	—	7,8 $\pm$ 0,3	56,9 $\pm$ 1,9	5,8 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,7	14,8 $\pm$ 0,2	10,7 $\pm$ 1,6
9,369	43fach	6,6 $\pm$ 0,3	61,7 $\pm$ 3,7	6,7 $\pm$ 0,8	4,8 $\pm$ 0,4	12,1 $\pm$ 0,8	8,3 $\pm$ 1,0
Unterschied im t-Test		p < 0,05	p < 0,1	p < 0,2	p < 0,2	p < 0,001	p < 0,05
0,256	—	8,1 $\pm$ 0,9	57,0 $\pm$ 1,6	6,6 $\pm$ 0,5	3,6 $\pm$ 0,1	12,7 $\pm$ 0,9	12,0 $\pm$ 1,3
18,378	72fach	5,5 $\pm$ 0,9	63,9 $\pm$ 1,7	6,2 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,7	11,1 $\pm$ 0,3	8,9 $\pm$ 0,6
Unterschied im t-Test		p < 0,02	p < 0,005	p < 0,25	p < 0,1	p < 0,05	p < 0,01
0,292	—	5,3 $\pm$ 0,5	54,9 $\pm$ 1,5	4,5 $\pm$ 0,4	3,9 $\pm$ 0,3	16,0 $\pm$ 1,8	15,3 $\pm$ 1,3
27,380	94fach	5,7 $\pm$ 0,5	60,9 $\pm$ 2,2	6,5 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,4	11,6 $\pm$ 1,5	10,2 $\pm$ 0,2
Unterschied im t-Test		p < 0,3	p < 0,005	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,02	p < 0,001
0,349	—	6,7 $\pm$ 0,5	56,4 $\pm$ 1,3	6,4 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 0,4	15,9 $\pm$ 0,9	9,3 $\pm$ 0,7
25,405	73fach	5,5 $\pm$ 0,3	57,7 $\pm$ 1,8	7,3 $\pm$ 0,4	6,2 $\pm$ 0,3	13,9 $\pm$ 0,5	9,4 $\pm$ 0,6
Unterschied im t-Test		p < 0,01	p < 0,3	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,02	p < 0,9
0,382	—	6,4 $\pm$ 0,4	59,7 $\pm$ 0,9	6,7 $\pm$ 0,4	4,9 $\pm$ 0,5	15,1 $\pm$ 0,3	7,1 $\pm$ 0,3
28,649	75fach	5,7 $\pm$ 0,2	60,0 $\pm$ 1,3	7,7 $\pm$ 0,3	5,6 $\pm$ 0,5	11,9 $\pm$ 0,4	9,1 $\pm$ 0,8
Unterschied im t-Test		p < 0,005	p < 0,8	p < 0,01	p < 0,2	p < 0,001	p < 0,005
0,432	—	6,1 $\pm$ 0,3	61,5 $\pm$ 1,5	6,2 $\pm$ 0,3	3,9 $\pm$ 0,2	11,6 $\pm$ 0,3	10,7 $\pm$ 0,7
25,225	58fach	4,6 $\pm$ 0,5	65,8 $\pm$ 0,7	6,5 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,3	10,3 $\pm$ 0,6	7,7 $\pm$ 0,4
Unterschied im t-Test		p < 0,005	p < 0,005	p < 0,2	p < 0,001	p < 0,02	p < 0,001

albumin,  $\beta$ -Globulin und Albumin. Bei der Beurteilung des individuellen Fehlers ist zu berücksichtigen, daß hierin der absolute Gerätefehler enthalten ist: Beide Fehler sind wiederum Bestandteil von Bandenfehler und Zeitfehler, die z. T. größer sind als der absolute Gerätefehler. Obwohl das hier dargelegte relativ geringe Zahlenmaterial nur Stichprobencharakter aufweisen kann, ist daraus ersichtlich, daß im Liquorpherogramm auf *nicht*-transparenter Celluloseacetatfolie die Messung der  $\gamma$ -Globulinbande mit dem größten Fehler behaftet ist (8–13%), dann folgen  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Globulinfraktion (4–8%) und die Präalbuminfraktion, die je nach ihrer Konzentration einen Variationskoeffizienten von 3–16% aufweisen kann. Die Albumin- und  $\beta$ -Globulinfraktion zeigen den niedrigsten Fehler von 1–3 bzw. 2–7%.

### Diskussion

Die Proteinelektrophorese von konzentriertem Liquor cerebrospinalis auf transparenter Celluloseacetatfolie ist mit zwei schlecht kontrollierbaren Fehlern behaftet:

1. Denaturierungsvorgänge und Verluste an Liquorproteinen während der zeitaufwendigen Einengung größerer Liquormengen;
2. Verlust an Protein-gebundenem Farbstoff beim Transparentmachen der Folie (vgl. 29).

In dieser Arbeit wird versucht, diese beiden Fehler näher zu charakterisieren und eine empfindliche Mikro-Methode der Liquorproteinelektrophorese auszuarbeiten, die diese Mängel nicht aufweist.

Tab. 5. Fehlerermittlung bei der Liquorelektrophorese auf nichttransparenter Celluloseacetatfolie. Einzelheiten s. Methodik.

Bezeichnung des Fehlers	Liquor- protein- gehalt [g/l]	Elektrophoresebanden (rel. %)					
		Präalbumin	Albumin	$\alpha_1$ -Globulin	$\alpha_2$ -Globulin	$\beta$ -Globulin ( $\beta_{1+2}$ )	$\gamma$ -Globulin
Absolute Gerätefehler							
Mittelwert von 10 Pherogrammen	0,382	5,9 $\pm$ 0,2	61,8 $\pm$ 1,5	5,8 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,4	14,8 $\pm$ 0,4	6,9 $\pm$ 0,8
Variationskoeffizient VK (%)		3,4	2,4	5,2	8,3	2,7	11,6
Individueller Fehler							
Mittelwert von 10 Pherogrammen	0,382	6,5 $\pm$ 0,3	58,6 $\pm$ 1,6	6,6 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,3	14,9 $\pm$ 0,3	8,3 $\pm$ 1,0
Variationskoeffizient VK (%)		4,6	2,7	6,1	5,9	2,0	12,0
Banden-Fehler							
Mittelwert von 10 Pherogrammen	0,811	2,4 $\pm$ 0,4	60,6 $\pm$ 1,4	5,1 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,4	13,9 $\pm$ 0,4	14,1 $\pm$ 1,2
Variationskoeffizient VK (%)		16,6	2,3	5,9	10	2,9	8,5
Zeitfehler							
1. Tag Mittelwerte von	0,382	6,4 $\pm$ 0,4	59,7 $\pm$ 0,9	6,7 $\pm$ 0,4	5,0 $\pm$ 0,4	15,1 $\pm$ 0,3	7,1 $\pm$ 0,3
10 Pherogrammen							
Variationskoeffizient		6,3	1,5	6,0	8,0	2,0	4,2
VK (%)							
40. Tag dito		6,1 $\pm$ 0,4	59,4 $\pm$ 1,0	6,6 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 0,4	14,7 $\pm$ 1,1	8,0 $\pm$ 0,5
		6,5	1,7	3,0	7,7	7,5	6,3
52. Tag dito		6,2 $\pm$ 0,7	60,7 $\pm$ 1,5	6,2 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,2	14,7 $\pm$ 0,4	7,2 $\pm$ 0,7
		11,3	2,5	8,1	4,0	2,7	9,7
240. Tag dito		6,6 $\pm$ 0,3	59,6 $\pm$ 0,5	6,4 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,3	14,6 $\pm$ 0,8	7,6 $\pm$ 1,0
		4,5	0,8	4,7	5,8	5,5	13,2

Daß während zweier verschiedenartiger Konzentrierungsmethoden Veränderungen in Zusammensetzung und Struktur der Liquorproteine auftreten, wurde in der vorigen Arbeit ausführlich dargestellt. Diese Arbeit zeigt außerdem, daß schon innerhalb 2stündiger Konzentrierung von kleineren Lumballiquormengen mittels Vakuum-Ultrafiltration mit einem Verlust an Präalbumin zu rechnen ist, das sich in den Poren der Kollodiumhüllen festsetzen dürfte (vgl. 11, 30, 31); zum anderen wandert offensichtlich Material der  $\gamma$ - und  $\beta$ -Globulinbanden in die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Globulinbanden. Hierbei handelt es sich einmal sehr wahrscheinlich um aggregierte bzw. polymerisierte Immunglobuline (vgl. 32–35), zum anderen um denaturierte Proteine (s. vorige Arbeit).

Beide Fehler (s. o.) lassen sich durch direktes Auftragen nativen Lumballiquors auf die Celluloseacetatfolie in der hier ausgearbeiteten Methodik beheben: Nach Zellabtrennung und Bestimmung des Gesamtproteins mittels Biuret-Methode werden 1 bis 2  $\mu$ l Liquor mit maximal 0,8  $\mu$ g Gesamtprotein direkt auf die Folie aufgetragen, bei 250 V für 30 min in einem 0,135 mol/l Veronal-Puffer getrennt, auf nicht-transparenter Folie direkt angefärbt und gescannt. Mit diesem Verfahren werden 6 Proteinfractionen erhalten, jedoch keine Auftrennung der  $\beta$ -Globulinfraction in  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Banden. Trotzdem zeigt es eine befriedigende Reproduzierbarkeit und kann innerhalb kürzerer Zeit durchgeführt werden als Verfahren mit vorgeschalteter Kon-

zentrierung von Liquor. Auch ist die benötigte Liquormenge von 1 bis 2  $\mu$ l minimal!

Bei dem hier angewandten Mikro-Verfahren muß beachtet werden, daß der lineare Anfärbbarkeitsbereich der Proteine mit Ponceau S im Vergleich zu gebräuchlichen Serum- und Liquorproteinelektrophoresen auf transparenter Celluloseacetatfolie (hier Linearität bis zu 50  $\mu$ g  $\cdot$  cm<sup>-2</sup> (36)) deutlich niedriger liegt, nämlich für Humanalbumin bis zu 5  $\mu$ g  $\cdot$  cm<sup>-2</sup>, für Human- $\alpha$ -Globulin bis 6  $\mu$ g  $\cdot$  cm<sup>-2</sup>, für denaturiertes Human- $\beta$ -Globulin und für Human- $\gamma$ -Globulin mindestens bis 10  $\mu$ g  $\cdot$  cm<sup>-2</sup>. Ob die größere Zahl an basischen Gruppen pro Albumin-Molekül im Vergleich zu Globulinen (37) mit dem kleineren linearen Anfärbbereich des Albumins in Beziehung gebracht werden kann, muß hier offenbleiben. Jedenfalls wird ein mit unseren Ergebnissen vergleichbarer linearer Anfärbbereich auch für andere Farbstoffe wie Amidoschwarz 10 B (38), Suprazenviolett (38) und Bromphenolblau (39) beim Anfärben von Proteinen auf Papier gefunden. Bei Papier wie Celluloseacetat als Träger nimmt die Farbstoffbindung einzelner nativer oder denaturierter Proteinfractionen für verschiedene Farbstoffe (Amidoschwarz 10 B (36), Nigrosin (18), Ponceau S (28, 36), Neucocin (36)) in folgender Reihenfolge ab: Albumin,  $\gamma$ -,  $\alpha$ -,  $\beta$ -Globuline, wobei die relative Anfärbbarkeit für  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Globuline für verschiedene Farbstoffe annähernd gleich groß sein dürfte (vgl. 36, und unsere Ergebnisse).

## Literaturverzeichnis

1. Ewerbeck, H. (1950), *Klin. Wochenschr.* 28, 692–693.
2. Esser, H. & Heinzler, F. (1952), *Deut. Med. Wochenschr.* 43, 1329–1330.
3. Bauer, H. (1953), *Deut. Z. Nervenheilk.* 170, 381–401.
4. Rossi, G. & Schneider, G. (1953), *Klin. Wochenschr.* 31, 969–975.
5. Steger, J. (1953), *Deut. Z. Nervenheilk.* 170, 106–121, 171, 1–19.
6. Schneider, G. & Wallenius, G. (1951), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 3, 145–150.
7. Schönnenberg, H. (1954), *Ann. Paediatr. (Basel)* 183, 309–320.
8. Delank, H. W. (1956), *Deut. Z. Nervenheilk.* 174, 429–442.
9. Plückthun, H. & Matthes, A. (1953), *Z. Kinderheilk.* 72, 521–531.
10. Franx, J. (1952), *Trav. Soc. Pharm. Montpellier* 13, 92–94.
11. Mumenthaler, M. & Märki, H. (1957), *Klin. Wochenschr.* 35, 1–7.
12. Schmidt, R. M. (1968), *Der Liquor cerebrospinalis*, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin.
13. Consbruch, U. & Koufen, H. (1968), *Deut. Med. Wochenschr.* 93, 2168–2172.
14. Schedifka, R., Klenz, G. & Helwin, H. (1969), *Acta Histochem.* 34, 148–156.
15. Maier, K. H. & Voggel, K. (1963), *Klin. Wochenschr.* 41, 286–290.
16. Mertin, J., Wisser, H. & Doerr, P. (1971), *diese Z.* 9, 337–340.
17. Krause, H. (1967), *Deut. Gesundheitsw.* 22, 1218–1221.
18. Rice, J. D. & Bleakney, B. (1965), *Clin. Chim. Acta* 12, 343–348.
19. Kaplan, A. (1967), *J. Med. Sci.* 253, 549–555.
20. Igou, P. C. (1967), *Amer. J. Med. Tech.* 33, 501–504.
21. Windisch, R. M. & Bracken, M. M. (1970), *Clin. Chem.* 16, 416–419.
22. Siemes, H. (1972), *Monatsschr. Kinderheilk.* 120, 262–264.
23. Weber, E. L. (1972), *J. Neurosurg.* 36, 679–686.
24. Hoch, H. & Barr, G. H. (1955), *Science* 122, 243–244.
25. Büttner, H., Hansert, E. & Stamm, D. (1970), in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U., Hrsg.), Bd. 1, 282, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
26. Dürr, U. (1968), *Ärztli. Lab.* 14, 437–446.
27. Gries, G., Aly, F. W. & Oldershausen, v. H. F. (1953), *Klin. Wochenschr.* 31, 644–649.
28. Schluep, U. (1956), *Zbl. Vet. Med.* 3, 341–358.
29. Webster, D. (1965), *Clin. Chim. Acta* 11, 101–112.
30. McGarry, E., Sehon, A. H. & Rose, B. (1953), *J. Clin. Invest.* 34, 832–844.
31. Frantzen, E., Frantzén, A., Jensen, R. & Fog, T. (1954), *Danish Med. Bull.* 1, 49–55.
32. Laurell, C. B. (1972), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, suppl. 124, 71–82.
33. Gavrilisco, K., Courcon, J., Hillion, P., Uriel, J., Lewin, L. & Grabar, P. (1955), *Nature (London)* 19, 976.
34. Scheiffart, F., Götz, H., Berg, G. & Hopfensperger, H. (1958), *Klin. Wochenschr.* 36, 678–681.
35. Kleine, T. O. (1969), *diese Z.* 7, 313–324.
36. Busse, V. & Dulce, H. J. (1969), *diese Z.* 7, 486–492.
37. Lewin, J. & Hillon, P. (1956), *Ann. Biol. Clin.* 14, 22, Zit. 38.
38. Simon, K. (1957), *Z. Inn. Med.* 12, 113–123.
39. Guillien, R. & Hermann, G. (1955), *Z. Naturforsch.* 10b, 206–210.
40. Graßmann, W. & Hannig, K. (1952), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 290, 1–27.

Prof. Dr. T. O. Kleine  
D-3550 Marburg/L  
Ortenbergstraße 8